

DANIELLA SERAFIN COUTO VIEIRA<sup>1</sup>ROZANY MUCHA DUFLOTH<sup>2</sup>FERNANDO CARLOS LANDER SCHMITT<sup>3</sup>LUIZ CARLOS ZEGERINO<sup>4</sup>

# Carcinoma de mama: novos conceitos na classificação

*Breast cancer: new concepts in classification*

## Revisão

### Palavras-chave

Neoplasias mamárias/diagnóstico  
Neoplasias mamárias/classificação  
Proteômica  
Análise de sequência com séries  
de oligonucleotídeos/métodos  
Prognóstico

### Keywords

Breast neoplasms/diagnosis  
Breast neoplasms/classification  
Oligonucleotide array sequence  
analysis/methods  
Proteomics  
Prognosis

## Resumo

O carcinoma de mama é a neoplasia maligna mais comum em mulheres. Estudos moleculares do carcinoma de mama, baseados na identificação do perfil de expressão gênica por meio do cDNA microarray, permitiram definir pelo menos cinco sub-grupos distintos: luminal A, luminal B, superexpressão do HER2, basal e normal breast-like. A técnica de tissue microarray (TMA), descrita pela primeira vez em 1998, permitiu estudar, em várias amostras de carcinoma, os perfis de expressão proteica de diferentes neoplasias. No carcinoma de mama, os TMAs têm sido utilizados para validar os achados dos estudos preliminares, identificando, desta forma, os novos subtipos fenotípicos do carcinoma de mama. Dentre os subtipos classicamente descritos, o grupo basal constitui um dos mais intrigantes subtipos tumorais e é frequentemente associado com pior prognóstico e ausência de alvos terapêuticos definidos. A classificação histopatológica do carcinoma de mama tem pobre valor preditivo. Portanto, a associação entre o diagnóstico histológico com técnicas moleculares nos laboratórios de anatomia patológica, por meio do estudo imunoistoquímico, pode determinar o perfil molecular do carcinoma de mama, buscando melhorar a resposta terapêutica. Este estudo visou resumir os mais recentes conhecimentos em que se baseiam os novos conceitos da classificação do carcinoma de mama.

## Abstract

Breast cancer is the principal cause of death from cancer in women. Molecular studies of breast cancer, based in the identification of the molecular profiling techniques through cDNA microarray, had allowed defining at least five distinct sub-group: luminal A, luminal B, HER-2-overexpression, basal and "normal" type breast-like. The technique of tissue microarrays (TMA), described for the first time in 1998, allows to study, in some samples of breast cancer, distinguished by differences in their gene expression patterns, which provide a distinctive molecular portrait for each tumor and the basis for and improved breast cancer molecular taxonomy. Another important implication is that genetic profiling may lead to the identification of new target for therapy and better predictive markers are needed to guide difficult treatment decisions. Additionally, the current pathology classification system is suboptimal, since patients with identical tumor types and stage of disease present different responses to therapy and different overall outcomes. Basal breast tumor represents one of the most intriguing subtypes and is frequently associated with poor prognosis and absence of putative therapeutic targets. Then, the purpose of this review was to resume the most recent knowledge about the breast carcinoma classification and characterization.

### Correspondência:

Rozany Mucha Dufloth  
Rodovia Amaro Antônio Vieira, 2.463, apto. 506, bloco C –  
Condomínio Residencial Solar de Francavilla – Itacorubi  
CEP 88034-102 – Florianópolis/SC  
Fone: (48) 3721-9473/ (48) 9132-0066  
E-mail: rozany@ccs.ufsc.br

### Recebido

14/09/2007

### Aceito com modificações

10/10/2007

Trabalho realizado no Departamento de Patologia da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC – Florianópolis (SC), Brasil; Departamento de Tocoginecologia da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP – Campinas (SP), Brasil; e no Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto – IPATIMUP – Porto, Portugal.

<sup>1</sup> Professora Auxiliar do Departamento de Patologia da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC – Florianópolis (SC), Brasil.

<sup>2</sup> Professora Adjunta do Departamento de Patologia; Professora Efetiva da Pós-graduação em Ciências Médicas e da Pós-graduação em Enfermagem da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC – Florianópolis (SC), Brasil.

<sup>3</sup> Professor Associado com Agregação da Faculdade de Medicina, Investigador Sênior do Instituto de Patologia e Imunologia Molecular; Diretor da Unidade de Patologia Molecular do Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto - IPATIMUP- Porto, Portugal.

<sup>4</sup> Livre-docente, Professor do Departamento de Tocoginecologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP – Campinas (SP), Brasil; Diretor do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas – Unicamp – Campinas (SP), Brasil.

## Características do carcinoma de mama

As pesquisas em câncer têm avançado rapidamente nas últimas décadas, mostrando ser uma doença que envolve alterações dinâmicas no genoma<sup>1</sup>. Várias linhas de pesquisa indicam que o processo de tumorigênese em humanos tem múltiplos estágios que refletem alterações genéticas, as quais conduzem ao processo de transformação de uma célula normal em uma célula maligna<sup>1</sup>. O grande objetivo no campo oncogenômico é tentar responder questões clinicamente relevantes, como quais tumores permanecerão inativos, quais pacientes necessitarão ou não de terapias sistêmicas e quais drogas deverão ser utilizadas<sup>2</sup>. As diversas entidades coletivamente chamadas de “câncer” resultam do acúmulo de mutações, instabilidades cromossômicas e alterações epigenéticas que promovem aumento da taxa de proliferação e dano celular, o que prejudica progressivamente o detalhado e complexo sistema de regulação do crescimento e da morte celular<sup>2</sup>.

O carcinoma de mama é a neoplasia maligna mais freqüente em mulheres<sup>3,4</sup>, com incidência mundial crescente<sup>5</sup>. A maior parte dos casos ocorre em países desenvolvidos, tendo a Holanda como o de maior incidência (90,2/100.000), seguido pelos Estados Unidos com taxa de 86,9/100.000<sup>6</sup>. Em 2006, o Ministério da Saúde estimou 472.050 casos novos de câncer no Brasil. Destes, o carcinoma de mama foi o mais incidente em mulheres, com 48.930 casos novos e risco estimado de 52 casos a cada 100 mil mulheres<sup>4</sup>.

O carcinoma invasivo de mama é definido como um grupo de tumores epiteliais malignos caracterizados por invadir o tecido adjacente e ter marcada tendência à metástase a distância<sup>3</sup>. A grande maioria destes tumores é derivado das células da unidade ducto terminal do lóbulo mamário, que são as células cuboidais luminais secretoras e as células mioepiteliais e/ou basais<sup>3,7,8</sup>. Caracterizam-se como neoplasias heterogêneas, com vários subtipos patológicos e diferentes aspectos histológicos, além de apresentações clínicas diferentes com diversas variações de respostas ao tratamento<sup>2,9,10</sup>.

Um dos maiores desafios para o estudo e tratamento do carcinoma de mama é a resolução da heterogeneidade tumoral característica destes carcinomas<sup>2,10</sup>. A classificação morfológica (anátomo-patológica) atualmente utilizada é insuficiente para caracterizar os carcinomas de mama, uma vez que os tumores com o mesmo grau, estágio e tipo histológico podem apresentar diferentes prognósticos e respostas à terapia<sup>11,12</sup>. Acredita-se que as limitações na classificação morfológica são devidas à incapacidade de considerar as características biológicas destes tumores<sup>13-16</sup>.

Recentes estudos citométricos identificaram, no DNA de carcinomas de mama, categorias diplóides, tetraplóides

e aneuplóide, que foram divididas em subtipos genomicamente estáveis e instáveis, através do *Stemline Scatter Index* (SSI)<sup>17</sup>. Kronenwett et al.<sup>17</sup> estudaram o valor prognóstico do SSI correlacionando com dados clínicos e verificaram que pacientes com carcinoma de mama que apresentaram subtipo genomicamente estável apresentavam sobrevida significativamente melhor, quando comparadas com o subtipo não estável. Além disso, verificaram que, entre a categoria aneuplóide, o subtipo instável apresentou maiores dimensões, tendeu a ser de alto grau e foi mais freqüentemente receptor de estrógeno e progesterona negativos, se comparado ao subtipo estável. Os autores concluíram que o SSI contribui para a avaliação dos pacientes quando informações clínico-biológicas são agregadas às categorias referentes à ploidia<sup>17</sup>.

Assim, tecnologias aplicadas nos estudos de DNA, RNA e do perfil das proteínas, podem ser usadas para retratar um fenótipo detalhado do tumor<sup>2,18</sup>. A caracterização sistemática e detalhada dos tumores em uma escala genômica pode ser correlacionada com informações clínicas, contribuindo, desta forma, para aumentar o entendimento das causas e progressões do carcinoma e para capacitar a descoberta de novos marcadores moleculares, possibilitando intervenções terapêuticas<sup>2,19,20</sup>.

Portanto, a proposta desta revisão é resumir os mais recentes conhecimentos em que se baseiam os novos conceitos da classificação molecular do carcinoma de mama.

## Desafios para o diagnóstico do carcinoma de mama – técnicas moleculares que têm contribuído para traçar o perfil da expressão gênica

Com o esclarecimento da estrutura da sequência do DNA humano e com o desenvolvimento paralelo de métodos com alta tecnologia, como o cDNA microarray, ocorreram grandes mudanças estratégicas nas pesquisas relacionadas ao câncer, tornando possível a análise da expressão do genoma<sup>21,22</sup>.

Particularmente, ferramentas genômicas, como o cDNA microarray, possuem grande potencial para decifrar os padrões moleculares dos tumores e para identificar novos e melhores marcadores clínicos<sup>21,22</sup>. A análise dos padrões de expressão gênica de milhares de genes usando cDNA microarrays tem demonstrado a grande diversidade entre os tumores que têm aparente semelhança histopatológica<sup>23</sup>, e a análise da expressão global pelo proteoma possibilitou revelar proteínas ou genes codificantes, que estão envolvidas nos processos dinâmicos ocorridos após as alterações do estado fisiológico, comparando a concentração celular antes e após estas alterações<sup>22</sup>.

Recentemente, a técnica do tissue microarray (TMA) permitiu revelar os perfis de expressão protéica em um

grande número de amostras teciduais agrupadas, validando os achados do cDNA microarray nos carcinomas de mama<sup>19,23,24</sup>.

Esta técnica foi descrita pela primeira vez em 1998, por Kononen et al.<sup>25</sup>, causando uma evolução na trajetória da pesquisa na área de ciências biomédicas. A sua utilização na determinação do perfil molecular no diagnóstico de neoplasias<sup>26</sup> possibilitou validar novos marcadores tumorais, correlacionar os resultados com a aplicação terapêutica<sup>26</sup> e, conseqüentemente, avaliar alvos moleculares em um grande número de amostras paralelas de tumor, num mesmo período de tempo, com o custo de uma única reação, pois resulta da construção de um bloco receptor que contém dezenas ou centenas de fragmentos cilíndricos de amostras tumorais retiradas de blocos originais de parafina. Para confecção dos blocos receptores, é necessário agrupar um grande número de casos, que podem variar de dezenas a centenas, dependendo do diâmetro da agulha extratora. As amostras dos fragmentos extraídos serão inseridas em um único bloco receptor<sup>19,23,25-28</sup>. Deste modo, o TMA permitiu a realização de experimentos nas mesmas condições técnicas com economia de tempo e de recursos, sendo uma poderosa ferramenta para a patologia investigativa aplicada<sup>27,28</sup>.

Ressalta-se que a principal utilização do TMA é em pesquisas que necessitam analisar tecidos com técnicas *in situ*, como a imunoistoquímica (IHC), a hibridização do RNA *in situ* e a hibridização fluorescente *in situ*<sup>21</sup>.

Nos casos dos carcinomas da mama, os TMAs têm sido utilizados para validar os achados de técnicas moleculares como o cDNA microarray, permitindo identificar os novos subtipos fenotípicos do carcinoma de mama<sup>19,29</sup>.

Tradicionalmente, a IHC, é um dos principais métodos para determinar o perfil de expressão protéica em anatomia patológica<sup>30</sup>. A maioria dos marcadores da IHC tem um papel bem estabelecido ou presumido, ou ainda representam proteínas cuja transcrição foi discriminada em estudos prévios de perfil gênico<sup>31</sup>.

Portanto, a caracterização na discriminação das proteínas pode fornecer novos marcadores úteis para análise, diagnóstico, prognóstico e monitoramento, e ajudar a desenvolver novos alvos moleculares para as drogas antitumorais<sup>19</sup>.

## Como diferenciar o carcinoma de mama por meio dos marcadores imunoistoquímicos mais utilizados em patologia mamária?

Desde o início desta década, o estudo do perfil molecular do carcinoma de mama vem mostrando um importante avanço a partir da identificação dos perfis de expressão gênica propostos por Perou et al.<sup>31</sup>, que foram

baseados em estudos com cDNA microarrays, em mais de 8.000 genes humanos, pertencentes a 42 pacientes. Subseqüentes análises mais refinadas foram realizadas em modelos propostos por outros pesquisadores<sup>32-36</sup>, e foi possível distinguir os subtipos tumorais e os atuais conceitos em que se baseia a classificação molecular, correlacionando os subtipos de carcinoma de mama com parâmetros clínicos relevantes, como o tempo de sobrevida e o tempo livre de doença<sup>16,19,20,29,32</sup>. De acordo com esta técnica, os carcinomas de mama foram subdivididos em cinco grupos: luminal A, luminal B, superexpressão do HER2, basal e normal breast-like.

O subtipo luminal A, cujo fenótipo é RE positivo e HER2 negativo, foi caracterizado pela elevada expressão de genes representados pelas células epiteliais luminais, como, por exemplo, as citoqueratinas 7, 8, 18 e 19. Este fenótipo está associado à assinatura de melhor prognóstico e responde à terapêutica com antiestrogênicos<sup>32</sup>. O subtipo luminal B, cujo fenótipo é RE positivo e HER2 positivo, foi caracterizado por baixa ou moderada expressão de genes expressos pelas células epiteliais luminais, como, por exemplo, as citoqueratinas 7, 8, 18 e 19. Este fenótipo está associado a pior prognóstico, sendo particularmente relacionado à recidiva tumoral, por apresentar possíveis similaridades com os tumores RE negativos (subtipos superexpressão do HER2 e basal)<sup>2,16,32</sup>.

O subtipo superexpressão do HER2, cujo fenótipo é RE negativo e HER2 positivo, foi caracterizado pela superexpressão de uma das moléculas da família dos receptores de fator de crescimento epidérmico, o HER2. A amplificação do oncogene HER2 e, concomitantemente, a superexpressão de sua proteína, é atualmente implicada como um importante biomarcador de prognóstico no carcinoma de mama<sup>2,23,37,38</sup>. Estes tumores apresentam boas respostas a drogas que bloqueiam a atividade do HER2, como, por exemplo, o anticorpo monoclonal trastuzumab<sup>19,20,24,37</sup>.

O subtipo basal, cujo fenótipo é RE negativo e HER2 negativo, foi caracterizado pela expressão de vários genes expressos nas células progenitoras ou células basais/mioepiteliais<sup>2</sup>. De acordo com as mais recentes publicações, este fenótipo mostra positividade para CK5, CK6, CK14, CK17, receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), P-caderina e p63, que são proteínas expressas nas células basais/mioepiteliais<sup>16,20,33,39-42</sup>. Este perfil está ligado a mutações genéticas no BRCA1<sup>2,40</sup>, e é um dos mais intrigantes subtipos tumorais, pois tem associação com pior prognóstico<sup>38,43,44</sup> e não possui alvo terapêutico definido, como os outros subtipos<sup>19</sup>. Portanto, não responde ao tratamento com drogas antiestrogênicas nem com o anticorpo monoclonal anti-HER2<sup>24,39</sup>.

A rigor, a grande maioria dos casos de carcinoma de mama são casos esporádicos e não têm associação com

história familiar<sup>45</sup>. Entretanto, 5 a 10% dos carcinomas da mama são hereditários<sup>46</sup> – a maior parte atribuída a mutações nos genes BRCA1<sup>47</sup> e BRCA2<sup>48</sup>.

Esses genes estão presentes em aproximadamente 80 a 90% dos casos hereditários, bem como em carcinomas de ovário<sup>49,50</sup>, e atuam como genes supressores tumorais com função no reparo do DNA<sup>51,52</sup>. Mutações no BRCA1 e no BRCA2 podem ocorrer em qualquer ponto ao longo do gene e são relativamente incomuns na população geral<sup>49</sup>. Os carcinomas de mama que carregam alterações no BRCA1 são frequentemente receptores de estrógeno/progesterona negativos. Nos casos esporádicos de carcinomas do subtipo basal, embora o tumor não apresente mutações no BRCA1, estudos recentes mostram que este gene está inativado por mecanismos como a metilação<sup>53</sup>.

O subtipo normal breast-like foi o último grupo identificado por Perou et al.<sup>31</sup> por meio do aumento da expressão de muitos genes conhecidos por serem expressos pelo tecido adiposo e por outros tipos de células não epiteliais. Estes tumores também mostraram forte expressão para genes epiteliais basais e baixa expressão para genes do epitélio luminal<sup>31</sup>. Apesar disso, atualmente ainda não está clara sua distinção nem seu valor clínico<sup>2</sup>.

### Como o patologista cirúrgico pode contribuir para prever o perfil basal? E qual a importância clínica para entender este perfil?

No grupo multidisciplinar do tratamento do carcinoma de mama, o patologista desempenha um papel crucial, pois os principais dados fornecidos no relatório devem revelar informações pertinentes sobre fatores prognósticos e preditivos para a resposta terapêutica<sup>54</sup>. Uma completa correlação entre o diagnóstico e o prognóstico do carcinoma de mama busca validar e assegurar o exame histopatológico clássico<sup>10</sup> além de analisar com segurança e reprodutibilidade as características biológicas do tumor<sup>55</sup>.

Neste sentido, a classificação de Tumores Malignos (TNM) proporcionou algumas características da doença que derivam de indicadores prognósticos, porém falhou ao proporcionar uma ferramenta para decidir sobre decisões terapêuticas<sup>56</sup>. Alguns autores chamam a atenção para a necessidade de se adaptar a atual classificação dos carcinomas de mama, adicionando informações relevantes que possam modificar as decisões terapêuticas<sup>41,43,44,56</sup>. Há várias razões para adaptar uma classificação, principalmente por permitir integrar características clínicas e patológicas relevantes<sup>52</sup>.

A classificação histopatológica do carcinoma de mama estratifica os tumores baseados no grau tumoral, no estágio e no tipo histológico, mas, mesmo correlacionando

com a sobrevida global, esta classificação tem pobre valor preditivo, pois tumores com grau histológico e estádios idênticos podem ter desfechos contrastantes<sup>57</sup>, com diferentes respostas terapêuticas e diferentes prognósticos<sup>42</sup>. Entretanto, o exame anátomo-patológico é o ponto de partida para o estudo molecular, pois, por meio do material recebido, pode-se determinar, por métodos imunoistoquímicos, o perfil de expressão, que inclui receptores hormonais e padrões de expressão proteica. Então, se olharmos a classificação molecular proposta por Perou et al.<sup>31</sup> e descrita acima, podemos entender que, na rotina da patologia cirúrgica, é possível reproduzir esta classificação utilizando marcadores imunoistoquímicos adequados para pesquisar proteínas relacionadas com os perfis de expressão gênica. Portanto, além de determinarmos a classificação morfológica, podemos adicionar ao relatório o perfil molecular do carcinoma de mama.

Os protocolos atuais de tratamento dependem de um sistema de classificação tumoral desprovido de informações que possam distinguir os grupos tumorais que são morfológicamente semelhantes, mas que apresentam diferenças no comportamento clínico e biológico<sup>57</sup>, pois a grande importância dos estudos que identificam os subtipos do carcinoma de mama está relacionada aos casos que apresentam receptores de estrógeno negativos, pois englobam dois padrões fenotípicos distintos, que são tumores com perfil basal e tumores com superexpressão do HER2, e estes dois subtipos específicos devem ser tratados como doenças distintas, se comparados aos tumores com subtipo luminal<sup>32,33</sup>.

### Considerações finais

Atualmente, um dos objetivos da investigação molecular do carcinoma de mama é encontrar alvos terapêuticos em tumores de todos os subtipos moleculares. Como os tumores luminais e os com superexpressão do HER2 têm protocolos definidos de tratamento, a investigação maior tem sido no subtipo basal. Neste contexto, o EGFR vem sendo descrito como alvo terapêutico para os carcinomas de cólon e carcinomas de pequenas células do pulmão<sup>58</sup>. A rigor, a expressão do EGFR no subtipo basal do carcinoma de mama levanta a possibilidade de terapias específicas anti-EGFR, sendo, portanto, um possível alvo terapêutico neste grupo<sup>58</sup>. Outros estudos mostram que o bloqueio da ação do “vascular endothelial growth factor”, por meio da inibição da angiogênese, parece ser outro possível alvo terapêutico<sup>59,60</sup>.

Em resumo, até o final da década passada, as pacientes que tinham o diagnóstico de carcinoma de mama eram tratadas como doenças semelhantes, baseado principalmente numa classificação morfológica que impossibilitava justificar por que os casos com o mesmo diagnóstico e estágio podiam ter desfechos clínicos marcadamente diferentes. As



deficiências na investigação dos diferentes tipos tumorais, como doenças distintas, podem ser explicadas pelas presumíveis limitações da classificação vigente, que utilizava somente critérios clínicos e morfológicos.

Hoje em dia, não há dúvida sobre a importância dos estudos do grupo de Stanford<sup>32</sup>, que, baseado em estudos com cDNA microarrays, impulsionou a classificação dos carcinomas de mama, ao introduzir conhecimentos sobre o perfil molecular.

Assim, um dos maiores desafios dos pesquisadores é melhorar os diagnósticos para direcionar condutas terapêuticas mais individualizadas, especialmente às pacientes com perfil basal, que estão relacionadas com um pior prognóstico e com um curso da doença mais agressivo, sem resposta à terapia utilizada. No futuro, o conhecimento genético sobre a carcinogênese mamária poderá servir de subsídio para orientar políticas de rastreamento e o melhor controle do carcinoma de mama.

## Referências

1. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
2. Sorlie T. Molecular portraits of breast cancer: tumour subtypes as distinct disease entities. *Eur J Cancer*. 2004;40(18):2667-75.
3. Tavassoli FA, Devilee P, editors. Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs. Lyon: WHO/IARC; 2003.
4. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2006: incidência de câncer no Brasil [texto na Internet]. Rio de Janeiro: INCA; 2005 [citado 2006 Set 6]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2006/versaofinal.pdf>
5. Parkin DM. Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol*. 2001;2(9):533-43.
6. Eisenberg ALA. Sobrevida de cinco anos para pacientes com carcinoma ductal infiltrante de mama sem comprometimento de linfonodos axilares. Coorte Hospitalar, 1992-1996. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz; 2004.
7. Birnbaum D, Bertucci F, Ginestier C, Tagett R, Jacquemier J, Charafe-Jauffret E. Basal and luminal breast cancers: basic or luminous? *Int J Oncol*. 2004;25(2):249-58.
8. Böcker W, Moll R, Poremba C, Holland R, van Diest PJ, Dervan P, et al. Common adult stem cells in the human breast give rise to glandular and myoepithelial cell lineages: a new cell biological concept. *Lab Invest*. 2002;82(6):737-46.
9. van't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*. 2002;415(6871):530-6.
10. Page DL, Jensen RA, Simpson JF. Routinely available indicators of prognosis in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 1998;51(3):195-208.
11. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*. 1991;19(5):403-10.
12. Reis-Filho JS, Westbury C, Pierga JY. The impact of expression profiling on prognostic and predictive testing in breast cancer. *J Clin Pathol*. 2006;59(3):225-31.
13. van de Vijver MR, He YD, Van't Verr LJ, Dai H, Hart AA, Voskuil, et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med*. 2002;347(25):1999-2009.
14. Putti TC, El-Rehim DM, Rakha EA, Paish CE, Lee AH, Pinder SE, et al. Estrogen receptor-negative breast carcinomas: a review of morphology and immunophenotypical analysis. *Mod Pathol*. 2005;18(1):26-35.
15. Kristensen VN, Sorlie T, Geisler J, Langerød A, Yoshimura N, Karesen R, et al. Gene expression profiling of breast cancer in relation to estrogen receptor status and estrogen-metabolizing enzymes: clinical implications. *Clin Cancer Res*. 2005;11(2 Pt 2):878s-83s.
16. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100(14):8418-23.
17. Kronenwett U, Ploner A, Zetterberg A, Bergh J, Hall P, Auer G, et al. Genomic instability and prognosis in breast carcinomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006;15(9):1630-5.
18. Sasco AJ. Breast cancer and the environment. *Horm Res*. 2003;60 Suppl 3:50.
19. Bertucci F, Birnbaum D, Gonçalves A. Proteomics of breast carcinoma: principles and potential clinical applications. *Mol Cell Proteomics*. 2006;5(10):1772-86.
20. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2004;10(16):5367-74.
21. Simon R, Mirlacher M, Sauter G. Tissue microarrays in cancer diagnosis. *Expert Rev Mol Diagn*. 2003;3(4):421-30.
22. Santos PM, Teixeira MC, Sá-Correa I. A análise proteômica quantitativa na revelação de mecanismos de resposta a stresse químico em microrganismos. Lisboa: Boletim de Biotecnologia; 2004.
23. Sorlie T, Wang Y, Xiao C, Johnsen H, Naume B, Samaha RR, et al. Distinct molecular mechanisms underlying clinically relevant subtypes of breast cancer: gene expression analyses across three different platforms. *BMC Genomics*. 2006;7:127.
24. Shak S. Overview of the trastuzumab (Herceptin) anti-HER2 monoclonal antibody clinical program in HER2-overexpressing metastatic breast cancer. Herceptin Multinational Investigator Study Group. *Semin Oncol*. 1999;26(4 Suppl 12):71-7.
25. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, Leighton S, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling tumor of specimens. *Nature Med*. 1998;4(7):844-7.
26. Zellweger T, Ninck C, Mirlacher M, Ansfeld M, Glass AG, Gasser TC, et al. Tissue microarray analysis reveals prognostic significance of syndecan-1 expression in prostate cancer. *Prostate*. 2003;55(1):20-9.
27. Kallioniemi O, Wagner U, Kononen J, Sauter G. Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer. *Hum Mol Genet*. 2001;10(7):657-62.

28. Hidalgo A, Piña P, Guerrero G, Lazos M, Salcedo M. A simple method for the construction of small format tissue arrays. *J Clin Pathol*. 2003;56(2):144-6.
29. Foulkes WD, Stefansson IM, Chappuis PO, Begin LR, Goffin JR, Wong N, et al. Germline BRCA1 mutations and a basal epithelial phenotype in breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2003;95(19):1482-5.
30. Marquez A, Wu R, Zhao J, Tao J, Shi Z. Evaluation of epidermal growth factor receptor (EGFR) by chromogenic in situ hybridization (CISH) and immunohistochemistry (IHC) in archival gliomas using bright-field microscopy. *Diagn Mol Pathol*. 2004;13(1):1-8.
31. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000;406(6797):747-52.
32. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98(19):10869-74.
33. Bertucci F, Houlgatte R, Benziene A, Granjeaud S, Adelaide J, Tagett R, et al. Gene expression profiling of primary breast carcinomas using arrays of candidate genes. *Hum Mol Genet*. 2000;9(20):2981-91.
34. Bertucci F, Bernard K, Llorid B, Chang YC, Granjeaud S, Birnbaum D, et al. Sensitivity issues in DNA array-based expression measurements and performance of nylon microarrays for small samples. *Hum Mol Genet*. 1999;8(9):1715-22.
35. Martin KJ, Kritzman BM, Price LM, Koh B, Kwan CP, Zhang X, et al. Linking gene expression patterns to therapeutic groups in breast cancer. *Cancer Res*. 2000;60(8):2232-8.
36. Perou CM, Jeffrey SS, van de Rijn M, Rees CA, Eisen MB, Ross DT, et al. Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial cells and breast cancers. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96(16):9212-7.
37. Ross JS, Fletcher JA. HER-2/neu (c-erbB2) gene and protein in breast cancer. *Am J Clin Pathol*. 1999;112(1 Suppl 1):S53-67.
38. Tanner M, Gancberg D, Di Leo A, Larsimont D, Rouas G, Piccart MJ, et al. Chromogenic in situ hybridization: a practical alternative for fluorescence in situ hybridization to detect HER-2/neu oncogene amplification in archival breast cancer samples. *Am J Pathol*. 2000;157(5):1467-72.
39. Matos I, Dufloth R, Alvarenga M, Zeferino LC, Schmitt F. P63, cytokeratin 5, and P-cadherin: three markers to distinguish basal phenotype in breast carcinomas. *Virchows Arch*. 2005;447(4):688-94.
40. Paredes J, Lopes N, Milanezi F, Schmitt FC. P-cadherin and cytokeratin 5: useful adjunct markers to distinguish basal-like ductal carcinomas in situ. *Virchows Arch*. 2007;450(1):73-80.
41. Paredes J, Albergaria A, Carvalho S, Schmitt FC. Basal-like breast carcinomas: identification by P-cadherin, P63 and EGFR basal cytokeratins expression. *Appl Cancer Res*. 2006;26(2):41-55.
42. Dufloth RM. Carcinoma de mama hereditário em mulheres brasileiras: mutações dos genes de BRCA1 e BRCA2, polimorfismos dos genes de reparo do DNA e caracterização imunoistoquímica pela técnica de tissue microarray [tese]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 2004.
43. Turner NC, Reis-Filho JS. Basal-like breast cancer and the BRCA1 phenotype. *Oncogene*. 2006;25(43):5846-53.
44. Dunkler D, Michiels S, Schemper M. Gene expression profiling: does it add predictive accuracy to clinical characteristic in cancer prognosis? *Eur J Cancer*. 2007;43(4):745-51.
45. Bennett IC, Gattas M, Teh BT. The management of familial breast cancer. *Breast*. 2000;9(5):247-63.
46. Palacios J, Honrado E, Osorio A, Cazorla A, Sarrio D, Barroso A, et al. Immunohistochemical characteristics defined by tissue microarray of hereditary breast cancer not attributable to BRCA1 or BRCA2 mutations: differences from breast carcinomas arising in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Clin Cancer Res*. 2003;9(10 Pt 1):3606-14.
47. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*. 1994;266(5182):66-71.
48. Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Swift S, Seal S, Mangion J, et al. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature*. 1995;378(6559):789-92.
49. Thull DL, Vogel VG. Recognition and management of hereditary breast cancer syndromes. *Oncologist*. 2004;9(1):13-24.
50. Ford D, Easton DF, Stratton M, Narod S, Goldgar D, Devilee P, et al. Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet*. 1998;62(3):676-89.
51. Crook T, Crossland S, Crompton MR, Osin P, Gusterson BA. p53 mutations in BRCA1-associated familial breast cancer. *Lancet*. 1997;350(9078):638-9.
52. Scully R, Chen J, Plug A, Xiao Y, Weaver D, Feunteun J, et al. Association of BRCA1 with Rad51 in mitotic and meiotic cells. *Cell*. 1997;88(2):265-75.
53. Turner NC, Reis-Filho JS, Russell AM, Springall RJ, Ryder K, Steele D, et al. BRCA1 dysfunction in sporadic basal-like breast cancer. *Oncogene*. 2007;26(14):2126-32.
54. Billis A, Vassallo J. Patologia diagnóstica de tumores. Campinas: Impressão Digital do Brasil; 2004.
55. Gouvea AP, Milanezi F, Olson SJ, Leitao D, Schmitt FC, Gobbi H. Selecting antibodies to detect HER2 overexpression by immunohistochemistry in invasive mammary carcinomas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2006;14(1):103-8.
56. Veronesi U, Viale G, Rotmensz N, Goldhirsch A. Rethinking TMA: breast cancer TNM classification for treatment decision-making and research. *Breast*. 2006;15(1):3-8.
57. Callagy G, Cattaneo E, Daigo Y, Happerfield L, Bobrow LG, Pharoah PD, et al. Molecular classification of breast carcinomas using tissue microarrays. *Diagn Mol Pathol*. 2003;12(1):27-34.
58. Castilho L, Etienne-Grimaldi MC, Fischel JL, Formento P, Magne N, Milano G. Pharmacological background of EGFR targeting. *Ann Oncol*. 2007;15(7):1007-12.
59. Bando H. Vascular endothelial growth factor and bevacitumab in breast cancer. *Breast Cancer*. 2007;14(2):163-73.
60. Costa C, Soares R, Schmitt F. Angiogenesis: now and then. *APMIS*. 2004;112(7-8):402-12.